

大腸がん細胞株のL-アスコルビン酸に対する薬剤耐性の詳細な解析

○高橋晃平（千葉工業大学院 先進工学研究科 生命科学専攻）

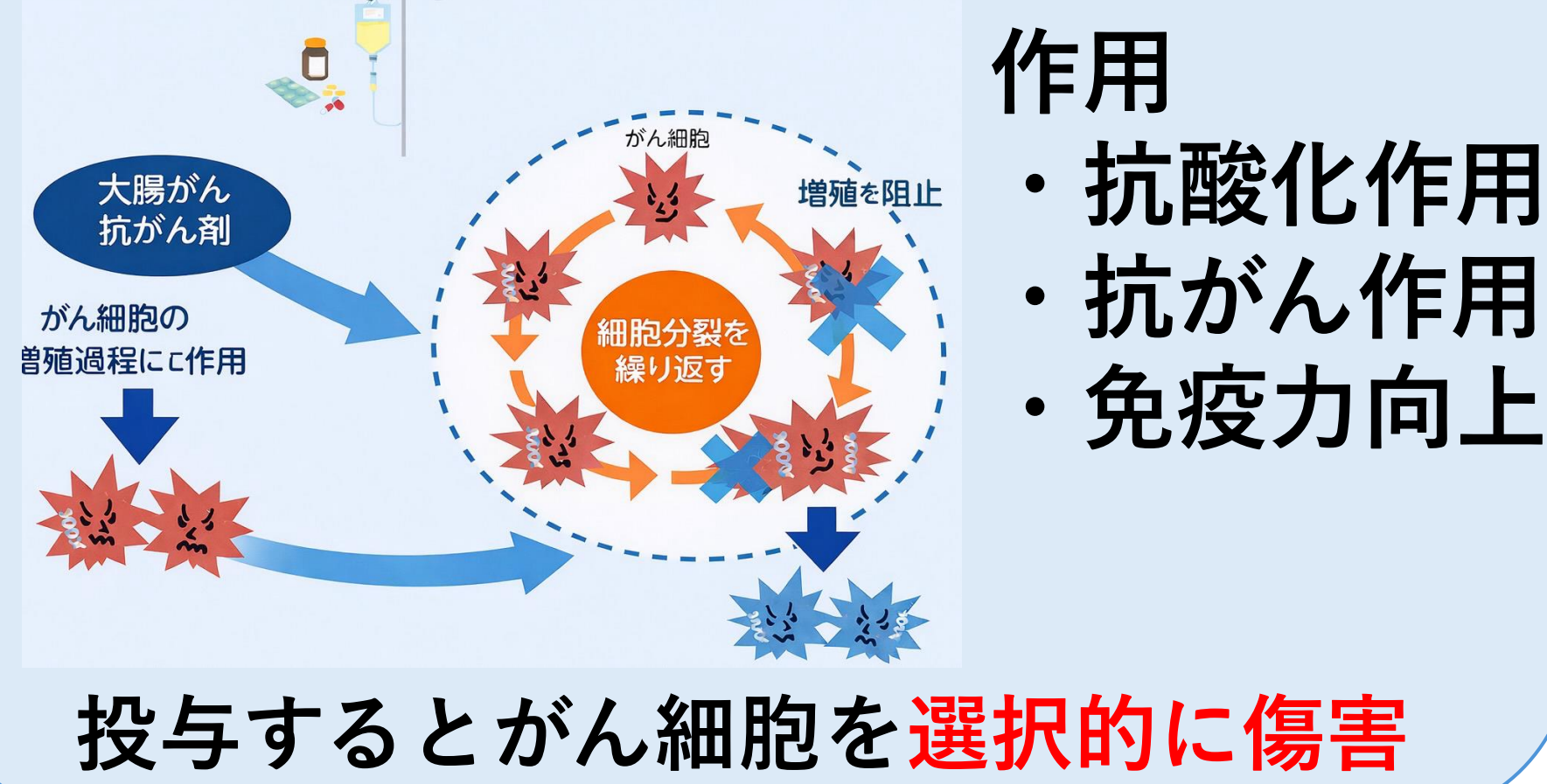
背景

大腸がんにおける化学治療法にて薬剤の標的が変化 → 大腸がん細胞が薬剤耐性の獲得を示唆

現状：大腸がんの化学療法

- 術前化学療法
 - 術後化学療法
 - 殺細胞性抗がん剤
 - 分子標的薬
 - 免疫チェックポイント阻害剤
- 利点**
- がんの縮小や根絶
 - 再発予防や延命効果
 - 全身への効果
- 欠点**
- 骨髄の抑制
 - 消化器症状
 - 薬剤標的の変化

本研究：L-アスコルビン酸



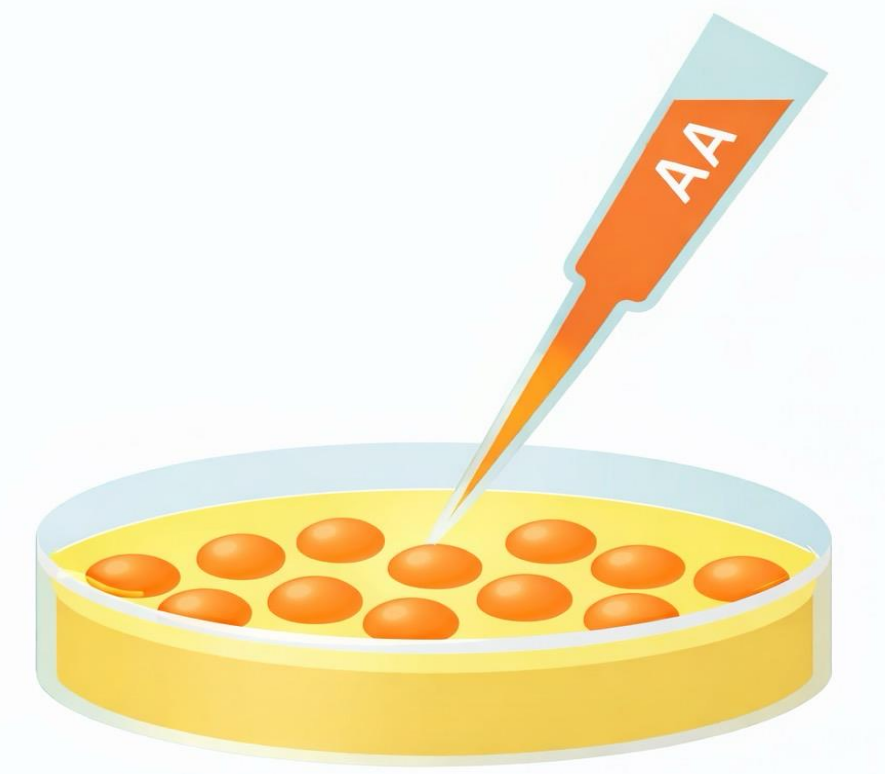
最終目標：新たな治療戦略の貢献

L-アスコルビン酸による耐性の獲得
↓
その機能や遺伝子などを解析
↓
薬剤感受性増強機構の解明
↓
大腸がん治療の化学療法における貢献

大腸がん治療における抗がん剤の使用が有名
耐性獲得や薬剤の標的変化について解明がされていない

薬剤耐性の獲得とその機能が不明確

薬剤耐性株を作成
解析による薬剤感受性
増強機構の解明？



目的

大腸がん細胞株COLO205に対するL-アスコルビン酸（AA）による薬剤感受性増強機構についての詳細な解析

○細胞培養実験 ○細胞毒性試験 【○dish内の細胞数及び生存率 ○プレート内の生存率】

結果・考察

○細胞培養実験

- 細胞培養液RPMI1640に10%FBSと1%P/S（ペニシリン/スプレブとマイシン）を添加
- dishに 1×10^4 cells/mL条件下の計2 mLで培養
- 播種後0,24,48,72h後の細胞数と生存率を計測
- 細胞数及び生存率はトリパンブルー染色法で計測

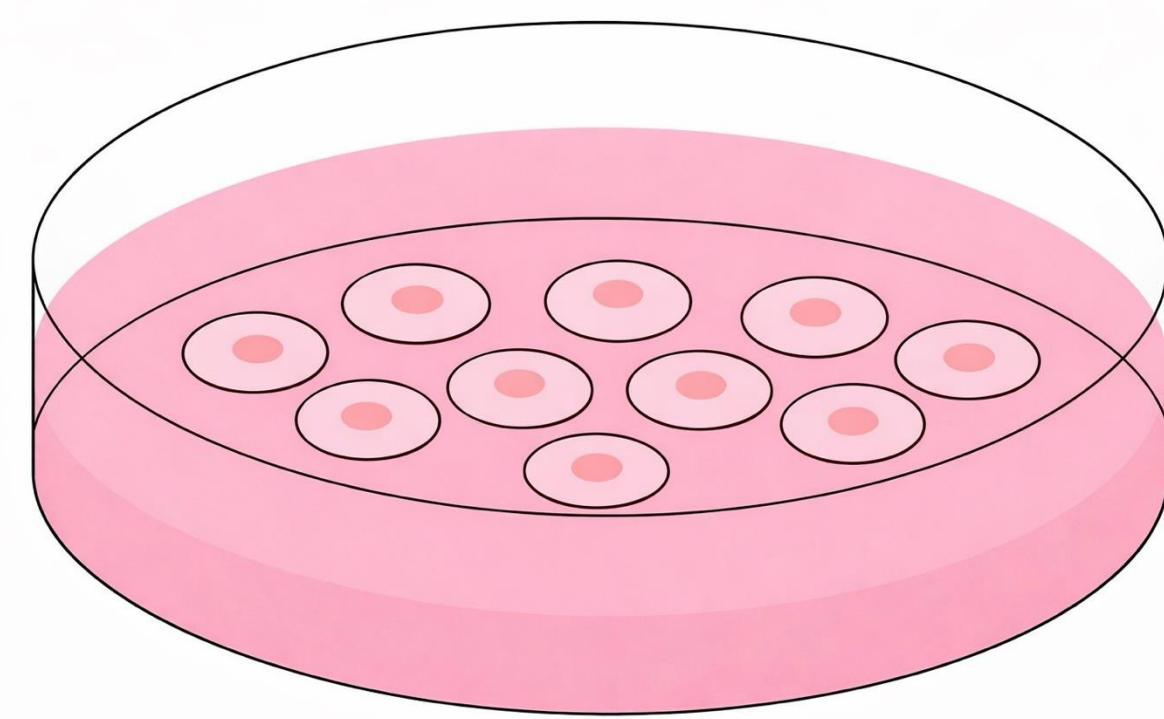


図1: 1×10^4 cells/mLの2 mLで培養

	1	2	3	4	5	6
A	NC	PBS	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM
B	NC	PBS	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM
C	NC	PBS	5 mM	10 mM	15 mM	20 mM
D						

図2: 1×10^4 cells/mLの1 mLで培養

○トリパンブルー染色法

- トリパンブルーの膜透過性を使用
- トリパンブルーは通常細胞膜を透過できない
- 細胞が死ぬことにより損傷した細胞膜を透過して細胞質を青く染色できる

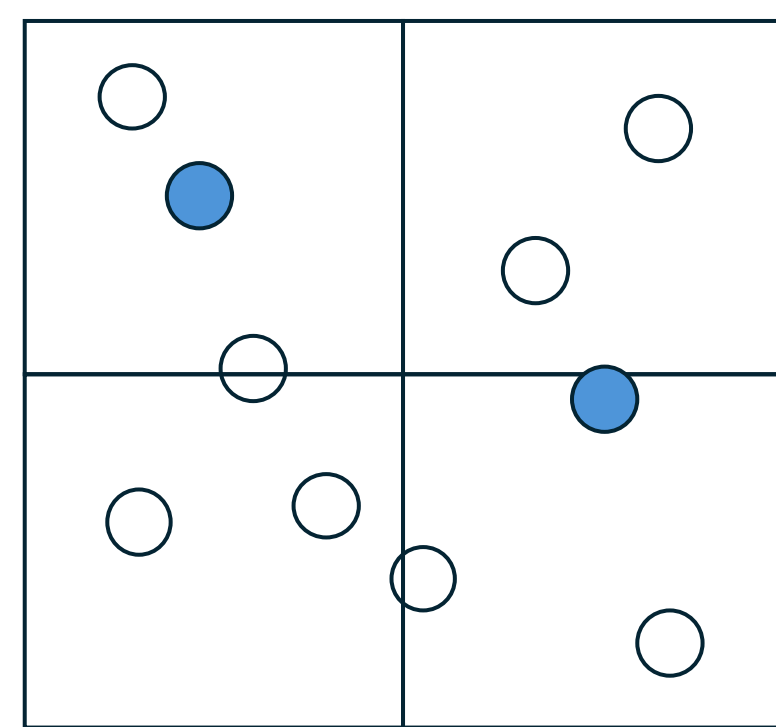


図3：血球計算盤

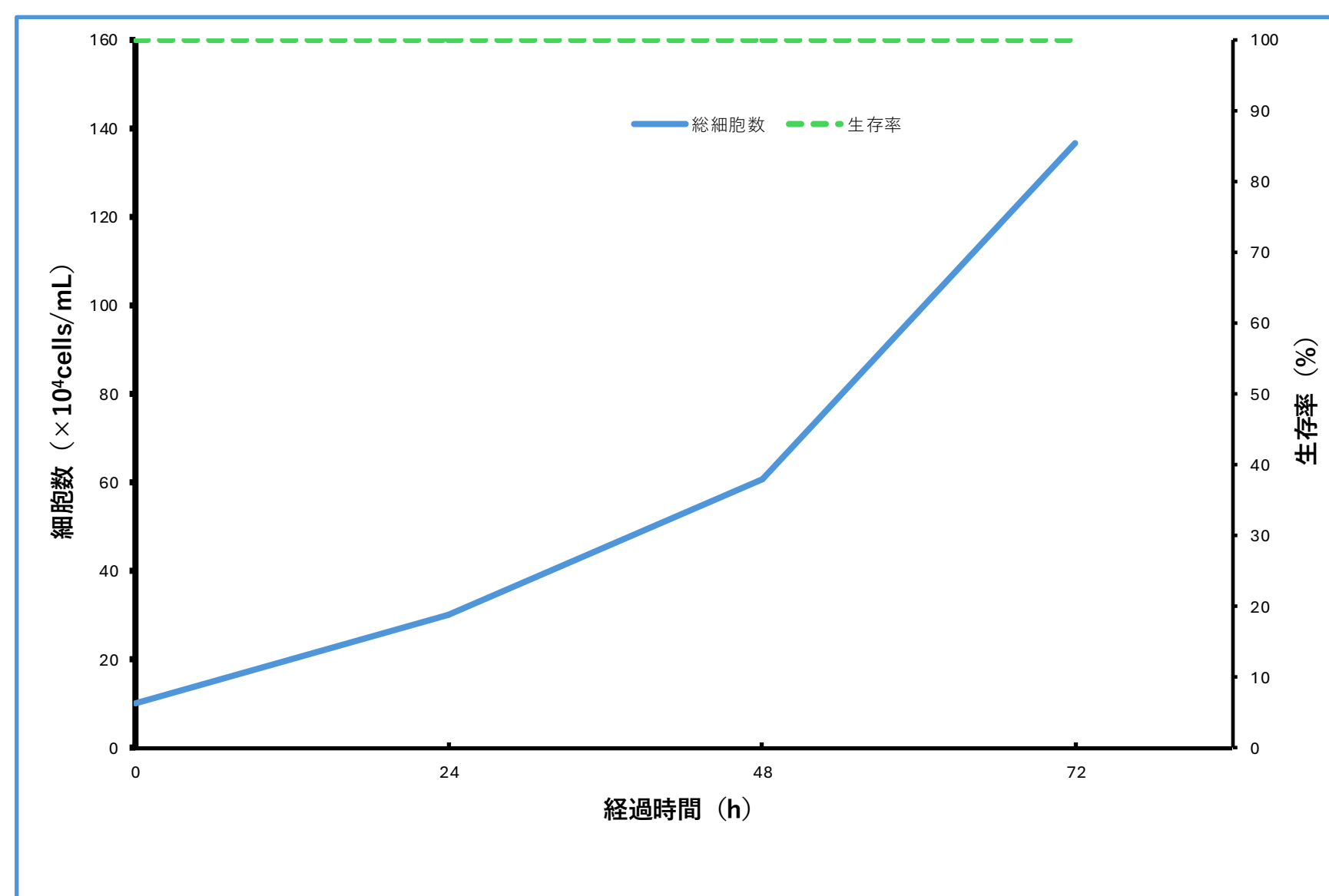


図4：COLO205の総細胞数・生存率の経時変化

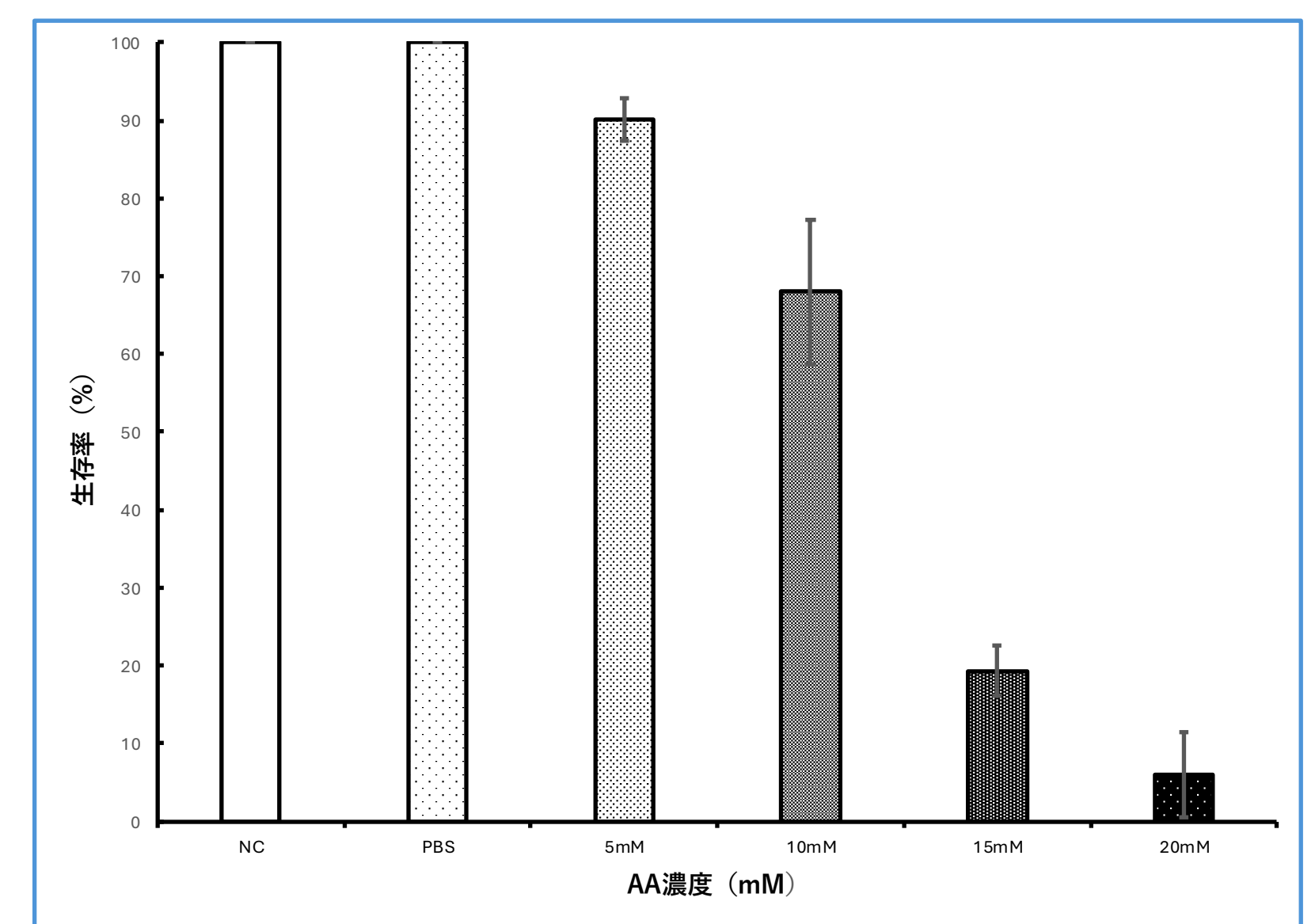


図5：AA投与48h後の生存率の経時変化

○細胞毒性試験

- L-アスコルビン酸の細胞毒性を調べるため、細胞播種24h後に様々な濃度で添加し生存率を計測
- NC, PBS, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mMのサンプルを使用

- COLO205細胞は、72時間経過において細胞が増殖し、生存率も100%を維持し続けていた。
- L-アスコルビン酸は、濃度依存的に細胞の生存率を低下させた。
- COLO205細胞に対する48h後の50%細胞毒性濃度（CC₅₀値）は、約**12 mM**であった。

まとめ・展望

細胞培養試験からCOLO205細胞の増殖能を確認できた。さらに細胞毒性試験から、

L-アスコルビン酸はCOLO205に対して濃度依存的に毒性を示し、またCC₅₀値は約12 mMであることがわかった

今後の展望：算出したCC50値を元にAA耐性株の作成し、L-アスコルビン酸による薬剤耐性についての増強機構の解析